

Indice

RELAZIONE FINALE VERSIONE INTEGRALE	3
1 INTRODUZIONE	3
2 MATERIALE E METODI (max 10 pagine)	8
2.1 Campionamento	8
2.2 Esami microbiologici	8
2.3 Antibigrammi	8
2.4 Analisi metagenomiche	10
2.5 Analisi dei dati	10
3 RISULTATI	11
3.1 QUADRO GENERALE	11
3.2 PREVALENZA DI CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI E MULTI-RESISTENTI NELLA FAUNA SELVATICA	12
3.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEGLI ISO- LATI BATTERICI	14
3.4 POOL METAGENOMICI	15
4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (max 10 pagine)	16
5 Raccomandazioni (max 2 pagine)	17
6 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)	17
Bibliografia	21

Elenco delle figure

1	Andamento annuale del numero di pubblicazioni relative all'AMR nella fauna selvatica. . . .	18
2	Comuni di provenienza dei campioni	19
3	distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici	19

Elenco delle tabelle

1	Caratterizzazione dei comuni di provenienza dei campioni	20
---	--	----

2	Distribuzione del numero e in % delle differenti specie di fauna selvatica di origine dei campioni di feci	20
---	--	----

ELENCO DEI COLLABORATORI

- **Dr. Tranquillo Vito** U.O. 1-Responsabile scientifico del progetto.Coordinamento delle U.O., Analisi statistica dei dati fenotipici.
- **Dr. Fiocchi Alfredo** U.O. 1-Analisi microbiologiche e antibiogrammi.
- **Dr. Pongolini Stefano** U.O. 2-Coordinamento U.O. e attività di analisi metagenomiche
- **Dr. Bolzoni Luca** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche e analisi dati
- **Dr. Erika** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche e analisi dati
- **Dr. Bertoletti Irene** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Alessandro Bianchi** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Loris Alborali** U.O. 4-Analisi genomiche ceppi Ceftiofur resistenti
- **Dr. Prati Paola** U.O. 5- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi
- **Dr. Gianni Sala** U.O. 6- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi

RELAZIONE FINALE VERSIONE INTEGRALE

1 INTRODUZIONE

L'Antibiotico-Resistenza (AR) è una grave minaccia per la salute in quanto compromette la capacità di trattare le infezioni sia in medicina umana che veterinaria. La resistenza agli antibiotici si sviluppa attraverso complessi meccanismi come la mutazione sotto la pressione selettiva, derivante dall'uso/abuso di antibiotici nel trattamento delle forme infettive batteriche o all'uso metafilattico o come promotori della crescita in zootecnia (pratica oramai illegale nella EU). La diffusione dell'antibiotico-resistenza è attribuita a scambi di DNA inter e intra-specifici, principalmente attraverso il trasferimento orizzontale di geni di resistenza localizzati su plasmidi che rappresenta il più importante meccanismo all'origine dell'acquisizione della resistenza in batteri patogeni rilevanti per la salute umana (Carattoli [2013](#)).

La principale strategia per ridurre l'incidenza del fenomeno antibiotico-resistenza si basa sulla riduzione dell'uso degli antibiotici sia nell'uomo che negli animali domestici, considerando che risulta chiaro che entrambi i comparti sono strettamente collegati e copartecipano al mantenimento e alla diffusione di batteri resistenti e di geni di resistenza (Angulo, Nargund, and Chiller [2004](#)). Queste misure si basano sul presupposto che la resistenza antimicrobica è associata a costi energetici che riducendo le performance riproduttive consentono ai batteri sensibili di superare quelli resistenti, quando non esiste una pressione selettiva legata ai farmaci antimicrobici, anche se sembra che questi costi siano estremamente variabili (Andersson and Hughes [2010](#)) e possano essere ridotti o addirittura trasformati in benefici per il fitness da mutazioni compensative (Luo et al. [2005](#)).

Va ricordato che batteri portatori di geni di resistenza si trovano naturalmente nei suoli in assenza di farmaci antimicrobici antropogenici a causa della produzione naturale di molecole antibiotiche da parte di alcuni batteri e funghi (Knapp [2013](#)). Il serbatoio di geni di resistenza nell'ambiente è quindi un mix di resistenza naturale e quella dovuta alle deiezioni di animali e uomini, a cui si possono aggiungere gli effetti selettivi di inquinanti, che possono co-selezionare elementi genetici mobili che trasportano più geni di resistenza. A questo proposito è stato stabilito che anche basse concentrazioni di antibiotici e metalli pesanti possono avere attività selettiva e indurre antibiotico-resistenza (Baker-Austin et al. [2006](#); Gullberg et al. [2011](#); Kohanski, DePristo, and Collins [2010](#)). La contaminazione ambientale dei determinanti di antibiotico-resistenza, può contribuire all'insorgenza e proliferazione di patogeni difficili o addirittura impossibili da trattare. In considerazione del potenziale impatto negativo sia sulla salute che economico della proliferazione ambientale di batteri antibiotico-resistenti, molti ricercatori, in linea con l'approccio One Health (Robinson et al. [2016](#)) includono

nelle valutazioni dell'antibiotico resistenza, anche la contaminazione ambientale del suolo, dell'acqua e della fauna selvatica (Allen et al. [2010](#)).

I dati disponibili mostrano che numerose specie di animali selvatici sono portatori di batteri antimicrobici resistenti in una vasta gamma di habitat, il che solleva la questione del loro ruolo nelle dinamiche di diffusione e mantenimento all'interfaccia tra popolazioni umane, animali domestici ed ecosistemi naturali. La presenza nella fauna selvatica, normalmente non sottoposta a trattamenti antibiotici, di ceppi batterici resistenti e in generale di geni di resistenza, è verosimilmente attribuibile a fenomeni di contaminazione ambientale. Per definire il ruolo della fauna selvatica nel complesso meccanismo di diffusione e mantenimento dell'antibiotico resistenza è necessario acquisire informazioni relativamente a: quali specie di batteri sono le più frequentemente trovate resistenti ai farmaci antimicrobici nei vertebrati selvatici e la loro caratterizzazione fenotipica e soprattutto genotipica; in che modo le specie selvatiche vengono colonizzate da batteri antibiotico-resistenti e quali scambi di tali batteri avvengono tra l'uomo, gli animali domestici e la fauna selvatica; cosa caratterizza gli habitat più contaminati da batteri antibiotico-resistenti e infine quali tratti ecologici favoriscono la colonizzazione e la potenziale infezione da batteri antibiotico-resistenti nella fauna selvatica ((Vittecoq et al. [2016](#))).

L'interesse per il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza è aumentato nel corso degli ultimi 10 anni, con un costante aumento della produzione scientifica, come evidenziato in (Fig1). La principale preoccupazione nasce dal timore che l'eventuale dimostrazione di un ruolo della fauna selvatica come “serbatoio” e “mantenimento” di batteri portatori di geni di resistenza, contribuendo alla contaminazione ambientale di batteri resistenti o materiale genetico di resistenza (resistoma), possa compromettere gli sforzi messi in atto, soprattutto in questi ultimi anni, in campo medico e veterinario per ridurre la diffusione del fenomeno della resistenza agli antibiotici.

Una scoping review pubblicata nel 2015 (Greig et al. [2015](#)), ha evidenziato la presenza di 866 articoli di ricerca primaria; Oltre il 90% erano studi osservazionali; la maggioranza riportano i dati di prevalenza per AR nella fauna selvatica (551/866, 63.6%). Ci sono stati 176 di 866 (20,3%) studi di genotipizzazione. AR è stata più frequentemente studiata in E. coli 150 di 866 (17,3%), Salmonella 83 di 866 (9,6%) e Enterococcus 48 di 866 (5,5%). I gruppi della fauna selvatica più frequentemente studiati erano uccelli 410 su 866 (47,3%), cervidi, 133 di 866 (15,4%) e roditori 91 di 866 (10,5%). Solo 11 articoli hanno studiato la contaminazione dei prodotti La contaminazione ambientale è stata più frequentemente riportata per l'acqua 130 di 866 (15%). Le modalità di trasmissione dell'AR è stata riportata in 110 articoli (12,7%). Tra le caratteristiche ambientali che sono state segnalate come fattori di rischio per il trasferimento di batteri patogeni e /o AR vi sono: condivisione di ambienti 161 di 866 (18,6%), infestazione o mancanza di controllo degli uccelli selvatici 124

di 866 (14,3%) e delle fonti idriche condivise 98 di 866 (11,3%). Le pratiche di mitigazione, strategie o programmi per ridurre la trasmissione di batteri e / o AR sono stati discussi o studiati in 124 su 866 (14,3%) articoli. Sono state fornite informazioni circa i tassi di contatto tra fauna selvatica e animali domestici in 29 articoli (3,3%). È interessante notare che numerosi articoli di ricerca primaria (122/866, 14.1%) hanno riportato associazioni per i fattori di rischio di trasmissione di AR o batteri patogeni dalla fauna selvatica agli animali cibo, fonti ambientali o umani.

Uno dei primi lavori in Italia sull'AR nella fauna selvatica è stato condotto da (Pagano et al. 1985) in ruminanti selvatici e marmotte del parco Nazionale dello Stelvio, in cui su 121 campioni di feci esaminati furono individuati 17 ceppi di E.coli antibiotico-resistenti. Nel 1991 (Caprioli et al. 1991) su 81 campioni di feci da mammiferi selvatici (ruminanti, marmotta) del Parco Nazionale dello Stelvio sono stati osservati complessivamente 18 ceppi di E.coli antibiotico-resistenti. I ceppi isolati hanno mostrato un profilo di multiresistenza. Gli Autori hanno concluso che i ceppi di E. coli in animali selvatici possono essere resistenti a diversi agenti antimicrobici e portatori di plasmidi R, anche se il microbioma intestinale degli animali selvatici non è direttamente esposta agli antibiotici. Così una possibile fonte di AR in E.coli potrebbe essere quegli esseri umani e animali domestici che portano AMRB e condividono gli stessi habitat (turisti, animali domestici pascolo) di animali della fauna selvatica.

Più recentemente sono stati pubblicati nuovi lavori che riguardano la presenza di antibiotico-resistenza in feci di animali selvatici in varie regioni d'Italia con particolare riferimento alle Enterobatteriacee e in particolare E.coli come microrganismo target.

Giacopello et al. (2016) hanno condotto nel 2013 uno studio osservazionale su 55 tamponi cloacali di diverse specie di avifauna selvatica raccolti da animali ospitati per varie cause presso un centro di recupero per volatili feriti della provincia di Messina. Dai tamponi sono stati isolati 83 ceppi appartenenti alle Enterobacteriacee sottoposti a test di suscettibilità ad un pannello di 16 antibiotici. La resistenza a Trimethoprim/Sulfamethoxazolo è risultata la più frequente fino ad un massimo dell'100% nel gruppo dei passeriformi, del 94% negli uccelli volatili e dell'84% nei rapaci. Importanti livelli di resistenza sono stati osservati anche nei confronti di streptomina, amoxicillina/clavulanico e ampicillina. I livelli di suscettibilità più elevati sono stati osservati verso antibiotici della famiglia delle cefalosporine. Sono state osservate differenze nel profilo di resistenza dei diversi gruppi tassonomici di avifauna indagata.

Camarda et al. (2006) riportano i risultati di uno studio osservazionale su 48 ceppi di *Escherichia coli* isolati da tamponi cloacali, raccolti nel 2002, in una colonia stanziale nella baia di Gallipoli (Lecce) di esemplari di Gabbiano corso (*Larus audouinii*). I test di suscettibilità hanno mostrato una resistenza mediamente

scarsa con oltre il 50% dei ceppi suscettibili a tutto il panel di antibiotici testati, il 30% resistente ad un solo antibiotico e il restante 20% resistente a 2 o più antibiotici.

Foti et al. (2011) hanno condotto uno studio osservazionale nel 2006 su campioni di uccelli migratori durante il loro passaggio sopra il territorio di Ustica in Sicilia. Sono stati raccolti 218 tamponi cloacali e 21 contenuti intestinali provenienti da soggetti rinvenuti morti. Sono stati isolati 183 ceppi di batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae e quasi tutti hanno mostrato un'elevata frequenza di suscettibilità al panel di antibiotici utilizzato. Le maggiori resistenze sono state osservate nei confronti di Ampicillina, Amoxicillina-Acido Clavulanico e Streptomina.

Sempre Foti et al. (2017) in uno studio osservazionale nel 2010 durante la migrazione annuale dei passeriformi nel territorio di Metaponto in Basilicata, hanno raccolto 121 tamponi cloacali di soggetti appartenenti all'ordine dei passeriformi da cui sono stati isolati 122 ceppi di Enterobacteriaceae. Lo studio di suscettibilità agli antibiotici ha mostrato una rilevante frequenza (superiore al 50%) di fenotipi di resistenza in particolare nei confronti di Ampicillina, Amoxicillina, Rifampicina e Amoxicillina-Acido Clavulanico. Rilevante è risultato di circa il 25% dei ceppi resistenti a Imipenem e circa il 7% di ceppi resistenti a Meropenem.

Uno studio osservazionale condotto nel territorio del Parco Nazionale dell'Aspromonte in Calabria nel periodo dal 2015-2017 da Foti et al. (2018) ha permesso di studiare la diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi di Enterobacteriaceae da mammiferi selvatici (Volpe, Mustelidi, Gatto selvatico e Lupo) utilizzando campioni di feci raccolti direttamente dall'ambiente. Sono stati isolati 221 ceppi di Enterobacteriaceae che hanno mostrato importanti frequenze di antibiotico-resistenza nei confronti di un panel di 20 antibiotici appartenenti a 10 differenti classi. In particolare viene sottolineato l'alta frequenza di ceppi resistenti al gruppo delle penicillinasi (amoxicillina, ampicillina e amoxicillina-ac.clavulanico), alle tetracicline e agli aminoglicosidi.

Bonardi et al. (2018) nel 2017-18 hanno condotto uno studio con l'obiettivo di evidenziare la presenza di *Escherichia coli* ESBL produttori a partire da isolati di *E.coli* da linfonodi mesenterici di Cinghiali, abbattuti nella provincia di Parma. Un solo ceppo di *Escherichia coli* su 108 esaminati, è risultato ESBL produttore dal punto di vista fenotipico e confermato genotipicamente attraverso l'evidenziazione del gene *bla_{TEM}*.

Turchi et al. (2019) nel 2017 hanno condotto uno studio osservazionale nel Parco Regionale delle Alpi Apuane in Toscana, focalizzando l'attenzione sul profilo fenotipico e genotipico di 71 ceppi di *Escherichia coli* isolati da 85 campioni di feci di mammiferi selvatici di diverse specie tra cui ungulati, carnivori e lagomorfi. La più alta frequenza di antibiotico-resistenze è stata osservata fenotipicamente in cefalotina (39%) e ampicillina (34%). Il 39% dei ceppi sono risultati negativi ai test d'identificazione dei geni di resistenza.

L'attività routinaria nel periodo tra il 2002 e il 2016 (anno di presentazione di questo progetto di ricerca) presso l'IZSLER mostra che sono stati eseguiti 404 antibiogrammi di ceppi di batteri isolati da animali selvatici. Tutti questi ceppi mostrano resistenza ad almeno un antibiotico. Nel 96% si è osservata multi-resistenza; 77% erano ceppi di *Salmonella* spp isolati da oltre 300 cinghiali. *E. coli* è stato il secondo ceppo più analizzato (51). Tra le altre specie di fauna selvatica indagate ci sono: 27 ruminanti, 22 uccelli, 42 lepri, 2 volpi e un riccio. Questi dati sono indicativi della presenza e della circolazione di batteri antibiotico-resistente e geni di antibiotico-resistenza nella fauna selvatica della Lombardia.

Sulla base di questi dati è stato progettato un studio osservazionale con l'obiettivo di raccogliere informazioni sulla presenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici della famiglia delle Enterobacteriacee isolati da feci di un ampio spettro di specie di fauna selvatica, presente in varie province della Lombardia con differenti gradi di urbanizzazione; la loro caratterizzazione fenotipica di resistenza e quella genotipica utilizzando metodiche di analisi metagenomica su pools di ceppi batterici di *Escherichia coli*.

Ahmed et al. ([2016](#))

2 MATERIALE E METODI (max 10 pagine)

2.1 Campionamento

Si è proceduto ad un campionamento non probabilistico di convenienza utilizzando sia i campioni raccolti durante le attività di sorveglianza del piano regionale fauna selvatica della Lombardia (cinghiali, ruminanti selvatici, lagomorfi, volatili) , sia i campioni provenienti da attività di sorveglianza del piano CWD (cervi e caprioli) e del piano West Nile Disease (Cornacchie, Gazze). I campioni di feci raccolti dall'intestino degli animali, direttamente in campo per i mammiferi abbattuti durante la stagione venatoria (prevalentemente cinghiali), o durante la necropsia per gli animali rinvenuti morti o volatili abbattuti nell'ambito del monitoraggio WND, sono stati stoccati a temperatura di congelamento in attesa di essere processati. La raccolta dei campioni è avvenuta nel periodo compreso tra la fine del 2017 e primi mesi del 2019.

2.2 Esami microbiologici

L'esame batteriologico è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nel metodo di prova interno IZSLER che descrive la tecnica microbiologica per la categorizzazione di isolati batterici aerobi/anaerobi facoltativi. I campioni di feci confezionati in sacchetti o barattoli o prelevati direttamente in sede necroscopica dall'intestino, sono stati disciolti in brodo di pre-aricchimento APT (acqua peptonata) e, dopo l'allestimento di tamponi, sono stati seminati su MC-Conkey Agar (terreno selettivo per enterobatteriacee) e incubati per 24-48 ore a 37°C in aerobiosi al fine di ottenere colonie isolate. Da una colonia isolata sono state realizzate colture su terreno solido Klieger Iron Agar (KIA) da utilizzare nelle successive prove di caratterizzazione (morfologica, colturale, biochimica). Il KIA costituisce un terreno differenziale impiegato principalmente come ausilio nell'identificazione di alcuni membri della famiglia delle Enterobacteriaceae. La differenziazione degli enterobatteri avviene in base alla loro capacità di fermentare il destrosio ed il lattosio e di produrre idrogeno solforato. Tutti i campioni sono stati successivamente sottoposti alla prova della citocromo ossidasi. Quelli risultanti ossidativi e fermentativi alla coltura su terreno Klieger sono stati testati per confermare fossero E.Coli (ossidasi negativo). I campioni risultati ossidasi positivi sono stati invece identificati con analisi biochimica mediante gallerie utilizzando il kit Microgen TM GnA + B-ID System.

2.3 Antibigrammi

Tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti al test di sensibilità agli antibatteri mediante la tecnica di diffusione in agar descritta nel metodo di prova interno per l'esecuzione dell'antibiogramma dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, redatto in conformità con le linee guida nazionali del Centro di

Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). E' stato utilizzato un panel di 7 antibiotici scelti sulla base delle Linee Guida per l'interpretazione delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici del Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico-resistenza (link alle linee guida). Le molecole selezionate sono indicate come molecole prototipo rappresentative delle diverse classi farmacologiche:

Ampicillina (AMP). Molecola prototipo di Beta-lattamici tipo Amoxicillina, Etacillina. Antibiotico classificato dal WHO (Organization and others [2019](#)) come **Critically Important Antimicrobial** e **High priority** in quanto incontra i criteri C1 e C2 dei criteri di categorizzazione e i criteri P2, e P3 dei criteri di prioritizzazione. Antibiotico a largo spettro di azione, usato in medicina umana e veterinaria sin dal 1961. L'ampicillina impedisce la formazione dei legami crociati tra le varie molecole di peptidoglicano (mureina), un componente fondamentale della parete cellulare batterica, e ne compromette la stabilità, rendendo così i batteri suscettibili allo shock osmotico. Alcuni batteri produttori dell'enzima beta-lattamasi (penicillinasi) possono inattivare l'antibiotico rendendo così il trattamento inefficace. E' uno dei pochi antibiotici attivo contro i ceppi multiresistenti di *Enterococcus faecalis* e *E.faecium*.

Tetraciclina (TET). Molecola prototipo di Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina, classificato dal WHO come **Highly important** antimicrobial, in quanto incontra solo il criterio C2 di classificazione. Antibiotico a largo spettro d'azione in uso dal 1978 sia in medicina umana che veterinaria. Batteriostatico, penetra nella cellula complessata a Mg^{2+} . Lega la sub-unità 30S impedendo l'accesso degli aminoacil-tRNA al sito recettoriale A del ribosoma;I batteri di solito acquisiscono resistenza alla tetraciclina dal trasferimento orizzontale di un gene che codifica per una pompa di efflusso o una proteina di protezione ribosomiale. Le pompe Efflux espellono attivamente la tetraciclina dalla cellula, impedendo l'accumulo di una concentrazione inibente della tetraciclina nel citoplasma (Chopra and Roberts [2001](#)). Le proteine di protezione ribosomiale interagiscono con il ribosoma e rimuovono la tetraciclina dal ribosoma, consentendo di continuare la traduzione (Connell et al. [2003](#)).

Ceftiofur (CFT). Molecola prototipo di Cefalosporine a spettro esteso come Cefoperazone, Cefpodoxime e Cefquinome, classificate come CIA e HPCI.....

Colistina (COL). Molecole non appartenente al panel consigliato dalla linee guida in quanto particolarmente critico per l'utilizzo in umana... e' stato inserito nel panel per verificare la presenza di resistenza a questo importante antibiotico in ceppi provenienti dalla fauna selvatica come misura del grado di contaminazione degli ambienti selvatici da parte di ceppi portatori di resistenza

Kanamicina (KAN). Molecola prototipo delle streptomicine quali Neomicina, Framicetina, classificata come

CIA.....

Enrofloxacin (ENR). Molecola prototipo dei fluorochinolonic, tra cui Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin. Antibiotici classificati come CIA e HPCI

Gentamicina (GEN). Molecola prototipo di streptomicine quali Tobramicina, Apamicina, classificata come CIA.....

2.4 Analisi metagenomiche

Le analisi metagenomiche sono state eseguite sui seguenti pools di ceppi di *Escherichia coli* costituiti secondo criteri di confrontabilità e rappresentatività di, area di campionamento, specie di provenienza, e in base alla disponibilità numerica; un ulteriore pool è costituito da ceppi di *Klebsiella pneumoniae* di particolare interesse come patogeno nosocomiale:

2.5 Analisi dei dati

I dati raccolti sono stati inseriti in foglio di lavoro denominato AMR in formato googlesheet e quindi importato in ambiente R (R-CRAN) per le successive analisi. AMR risulta costituito da 978 righe e 23 colonne. Si è proceduto ad eliminare 54 righe relative a campioni per i quali non è stato possibile isolare alcun ceppo. Il dataset finale contiene quindi le informazioni relative a 924 ceppi batterici isolati da campioni di feci di diverse specie di fauna selvatica. Complessivamente non è stato possibile l'identificazione di genere per 14 ceppi di Enterobacteriacee. AMR contiene i seguenti Per le analisi sulle caratteristiche territoriali delle aree campionate è stato utile MR-924: che contiene tutti i ceppi isolati su terreno McConkey e come tali appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee indipendentemente da AMR-911: che contiene tutti i ceppi di Enterobacteriacee identificati per genere

3 RISULTATI

3.1 QUADRO GENERALE

3.1.1 Territorio

L'attività di campionamento si è svolta tra Settembre 2017 e Dicembre 2019 in sette province della Lombardia : Bergamo, Pavia, Varese, Como, Lecco e Brescia da un totale di 224 comuni (Fig2). Sulla base dei criteri di classificazione dei comuni adottati dall'ISTAT, in merito a grado di urbanizzazione, e montanità risulta che : 415 campioni (57%) provengono da comuni a bassa urbanizzazione (aree rurali scarsamente popolate), 222 campioni (30%) da comuni a densità intermedia di popolazione e 11 campioni (1.15%) da comuni ad alta densità di popolazione; 472 campioni (65%) provengono da comuni totalmente montani, 162 (22%) da comuni in pianura e 14 campioni (2%), da aree parzialmente montane (collinari). In tabella 1 sono riportate le statistiche descrittive della caratterizzazione geografica e di popolazione dei comuni da cui provengono i campioni.

3.1.2 Fauna selvatica

Sono stati raccolti complessivamente 729 campioni di feci da 33 differenti specie di fauna selvatica. Le specie più frequentemente campionate sono il Capriolo (*Capreolus capreolus*) con 201 campioni (27.6%), la Cornacchia grigia (*Corvus cornix*) con 133 (18.2%), il Cervo (*Cervus elaphus*) , con 83 campioni (11.4%), il Cinghiale (*Sus scrofa*) con 78 campioni (10.7%), il Camoscio (*Rupicapra rupicapra*) 49 campioni (6.7%) e il Muffone (*Ovis aries musimon*) 44 campioni (6.0%) che rappresentano complessivamente l'80% dei campioni esaminati. Il restante 20% è distribuito su un totale di 27 specie differenti (tabella 2). -distribuzione territoriale dei gruppi specie (usare ARM-istat IDcamp filtrati. . .) Oltre il 90% di campioni dei gruppi-specie CERVIDI, BOVIDI e SUIDI proviene da territori classificati da ISTAT come Totalmente Montani (TM); il 75% dei campioni del gruppo CARNIVORI proviene da territori TM; l'86% dei campioni del gruppo CORVIDI proviene da territori Non Montani (NM) e il 50% dei campioni del gruppo RAPACI proviene da territori TM e il 50% da territori NM. Per tutti i gruppi specie risulta poco rappresentata la categoria territoriale Parzialmente Montano (tabella 2b) ISTAT sulla base della densità di popolazione per Km² classifica i comuni in 3 classi di urbanizzazione: 1=densamente popolato, 2=mediamente popolato, 3=scarsamente popolato (rurale). La distribuzione dei campioni dei diversi gruppi specie rispetto alle caratteristiche di urbanizzazione dei comuni di provenienza riflette quanto già visto per la montanità dei territori campionati, con una più alta frequenza di campioni provenienti da territori rurali e a densità media che da comuni ad elevata densità di popolazione. In particolare dai territori a bassa urbanizzazione (rurali) proviene il 72% dei campioni del

gruppo CERVIDI, il 75% dei campioni del gruppo BOVIDI, il 67% dei campioni del gruppo SUIDI, il 70% dei campioni del gruppo CARNIVORI, il 57% dei campioni dal gruppo CORVIDI e il 30% dal gruppo RAPACI (tabella 2c)

3.1.3 Esami microbiologici

Complessivamente sono stati isolati 978 ceppi batterici, di cui 911 identificati come appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee. *Escherichia coli* (E.coli) rappresenta il 67.6% dei ceppi isolati, il restante 32% dei ceppi è distribuito su un totale di 14 generi differenti (tabella 3). Per 67 ceppi non si è giunti all'identificazione basata sulle prove biochimiche di genere. Per questi ceppi non si è proceduto ad ulteriori approfondimenti diagnostici ma sono stati comunque archiviati in glicerolo e congelatore.

3.1.4 Antibigrammi

Sono stati eseguiti 910 antibiogrammi. Complessivamente 392 ceppi (43%) sono risultati Suscettibili (S) al panel di antibiotici testati ; 423 (46%) i ceppi Resistenti (R) fino ad un massimo di 2 antibiotici e infine 95 (10%) ceppi sono risultati Multiresistenti (MR), con resistenza a 3 o più antibiotici. La distribuzione del numero di resistenze al panel di antibiotici per isolato (Antibiogram length) mostra una decisa distribuzione asimmetrica (fig.2-hist).

3.2 PREVALENZA DI CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI E MULTI-RESISTENTI NELLA FAUNA SELVATICA

Complessivamente su 670 campioni di feci di fauna selvatica da cui è stato isolato almeno un ceppo di Enterobacteriacee e su cui è stato eseguito l'antibiogramma, 421 hanno almeno un ceppo resistente ad uno o più antibiotici del panel indagato, pari ad una Prevalenza complessiva (Overall Prevalence) del 63% (ICBayesiano: 59-66%). Nei CORVIDI si osserva la prevalenza più elevata (80%), mentre nei BOVIDI la più bassa (37%). A causa della bassa numerosità campionaria si osservano stime con incertezza molto ampia nei gruppi : LEPRE, ALTRI VOLATILI, UCCELLI ACQUATICI, CARNIVORI e RAPACI. (fig.3)

Su 670 campioni di feci, 92 presentano almeno un ceppo MULTI-RESISTENTE (numero di resistenze \geq a 3), pari ad una prevalenza del 14% (95%BCI:11%-16%). La prevalenza di animali selvatici portatori di ceppi multiresistenti varia da un minimo del 4% nel gruppo UCCELLI ACQUATICI ad un massimo del 37% nella LEPRE. La bassa numerosità dei campioni di alcuni gruppi specie rende le stime molto incerte(fig.4)

#Per 648 campioni è risultato disponibile il dato geografico e la caratterizzazione #territoriale ISTAT. Su questi campioni è stato possibile quindi valutare la relazione #tra prevalenza di capi selvatici portatori di

ceppi R e di ceppi MR e i caratteri #territoriali di provenienza dei campioni. Per questo tipo di valutazione sono stati #esclusi i dati riferiti ai gruppi specie meno numerosi: LEPRE, UCCELLI ACQUATICI , #ALTRI VOLATILI. Dopo esclusione di questi gruppi specie, il dataset comprendeva informazioni su 628 campioni. Si è proceduto quindi ad eliminare i record con valori Missing sulle seguenti variabili: R (resistenza Si NO), densità di popolazione, e altitudine, ottenendo un dataset di 603 campioni su cui si è proceduto ad effettuare l'analisi dei dati.

I dati Istat disponibili per esplorare l'associazione tra prevalenza di capi portatori di AR e indicatori di "contaminazione" derivati dai singoli comuni sono: densità di popolazione (da cui deriva la classificazione del grado di urbanizzazione dell'ISTAT), superficie in kmq del comune, altitudine (correlato alla densità di popolazione e alla classificazione di Montanità dell'ISTAT), superficie a pascolo, numero di capi domestici al pascolo (correlato alla superficie a pascolo), n. aziende al pascolo.

Esistono evidenze in letteratura che la presenza (prevalenza/occorrenza) di animali selvatici portatori di ceppi AR o MAR è da attribuire alla contaminazione ambientale e/o all'interazione tra specie domestiche e selvatiche. Viene quindi ipotizzata una relazione inversa tra indicatori indiretti di contaminazione ambientale (urbanizzazione, densità di popolazione) e d'interazione tra specie (esempio aree dedicate al pascolo, n. capi al pascolo...ecc... alpeggio...)

Tutte le variabili quantitative predittorie sono state standardizzate in accordo a quanto suggerisce Gelman, sia per una maggior interpretabilità dei coefficienti sia per una migliore performance del motore HCMCM che per una miglior utilizzo delle prior del modello...

La specificazione del modello si è basata su una valutazione DAG, che ha permesso di chiarire la dipendenza delle variabili e scegliere quelle da inserire nel modello.

Mediante il calcolo di WAIC e PSIS (criteri d'informazione) è stato selezionato un modello multilevel con la variabile "comune" con random effect (cluster di osservazioni) come predittori: Specie, Specie*Pascolo, Pascolo, Urbanizzazione. Le variabili quantitative sono state preventivamente standardizzate.

Dal modello risulta che la probabilità che un animale della fauna selvatica sia portatore di almeno un ceppo di Enterobacteriaceae resistente ad almeno un ab del panel indagato aumenta all'aumentare della dimensione dell'area adibita a pascolo condizionalmente al gruppo specie di appartenenza, e tende ad aumentare all'aumentare della densità di popolazione per Km² con indicatore di urbanizzazione del territorio. In tabella x sono riportate le stime a posteriori dei coefficienti di regressione e i rispettivi intervalli di credibilità.

3.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEGLI ISOLATI BATTERICI

La maggior parte dei ceppi (oltre l'80%) ha mostrato resistenza nei confronti di AMP (392 ceppi 42.47%) e TET (342 ceppi 37.05%) in cui si osserva una ampia variabilità nei differenti gruppi di Specie (Fig3).

In particolare, escludendo i ceppi derivati da gruppi specie con ridotta dimensione del campione, la maggior frequenza di ceppi resistenti a AMP si osserva negli isolati del gruppo CORVIDI (58%), del gruppo CERVIDI (45%) e RAPACI (42%); le frequenze minori si osservano nel gruppo BOVIDI (26%) e SUIDI (22%). Le resistenze alle tetracicline sono risultate più frequenti nei ceppi isolati dai CORVIDI (51%) e RAPACI (48%), mentre le più basse in isolati da SUIDI (34%), CERVIDI(32%), BOVIDI(20%).

Nei confronti della COLISTINA, antibiotico di particolare interesse in ambito clinico umano, classificato come. . . . si osserva una bassa frequenza di ceppi resistenti da un minimo dello 0.5% osservato nei ceppi isolati dai SUIDI, ad un massimo del 16% osservato sia nei RAPACI che nella LEPRE. Anche per il CEFTIOFUR , cefalosporina di 3 generazione nei confronti dei quali si è diffusa a livello mondiale la selezione di ceppi ESBL. . . si osserva una bassa prevalenza di ceppi resistenti: minimo 2.1% negli UCCELLI ACQUATICI, massimo 24% nei RAPACI. La GEN risulta l'antibiotico verso cui gli isolati si sono mostrati in modo uniforme tra le differenti specie meno resistenti (12 ceppi 1.30%). Anche per ENR e KAN si osserva una bassa e uniforme prevelenza di ceppi resistenti tra i diversi gruppi specie. (tabella 4)

Il profilo di resistenza tra i differenti generi di ceppi isolati conferma che AMP e TET sono gli antibiotici verso i quali la maggior parte degli isolati mostra la maggior frequenza di resistenze (tabella 5).

Si osservano 39 differenti profili di co-resistenza (da 1 a più AB) (fig.6). I profili più frequenti risultano: TET-AMP (141 ceppi), AMP (130 ceppi), TET (85 ceppi), CFT-TET-AMP (27 ceppi), COL-TET-AMP (14 ceppi), COL-TET (12 ceppi) e CFT-TET (12 ceppi), che rappresentano più dell'80% dei ceppi. Il restante 20% è distribuito nei restanti 32 profili.

Diversità ecologica dei differenti profili di antibiotico-resistenza La figura 6 illustra la distribuzione dei ceppi in base al profilo di co-resistenza e la specie di fauna selvatica da cui provengono. Si può osservare la "rarietà" di molti profili presenti solo in determinati gruppi Specie. Complessivamente si osserva una scarsa uniformità di profili tra i gruppi specie, con una particolare ricchezza di differenti profili nel gruppo CERVIDI e CORVIDI che sono i più rappresentati ma anche nei ceppi isolati dai RAPACI sebbene in numero sensibilmente più ridotto rispetto ai precedenti.

Gli indici di diversità (tab.6)sono riassunti in un grafico di Renyi entropy standardizzato (fig.7). Nella

popolazione di CERVIDI si osserva un profilo di dominanza in termini di diversità con una minore diversità di profili di co-resistenza con una forte dominanza di pochi profili. AL contrario i gruppi specie BOVIDI, SUIDI, CARNIVORI, LEPRE, UCCELLI ACQUATICI e ALRI VOLATILI, mostrano un profilo di uniformità (evenness), quindi caratterizzato da maggiore diversità senza la presenza di profili di co-resistenza relativamente dominanti. Le popolazione di CORVIDI e RAPACI mostrano un sovrapponibile profilo di diversità intermedio rispetto a quello di dominanza dei CERVIDI e di evenness degli altri gruppi-specie.

#interazione selvatici-domestici? dati di sondrio confronto (da fare)

Caratterizzazione genomica dei ceppi ceftiofur-resistenti La resistenza dei ceppi isolati al Cefotiofur è risultata poco frequente (prev....)

3.4 POOL METAGENOMICI

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (max 10 pagine)

5 Raccomandazioni (max 2 pagine)

5.0.1 elementi gestionali e/o diagnostici

5.0.2 indicazioni per la ricerca

5.0.3 sugg per eventuali provvedimenti normativi

6 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)

ELENCO FIGURE

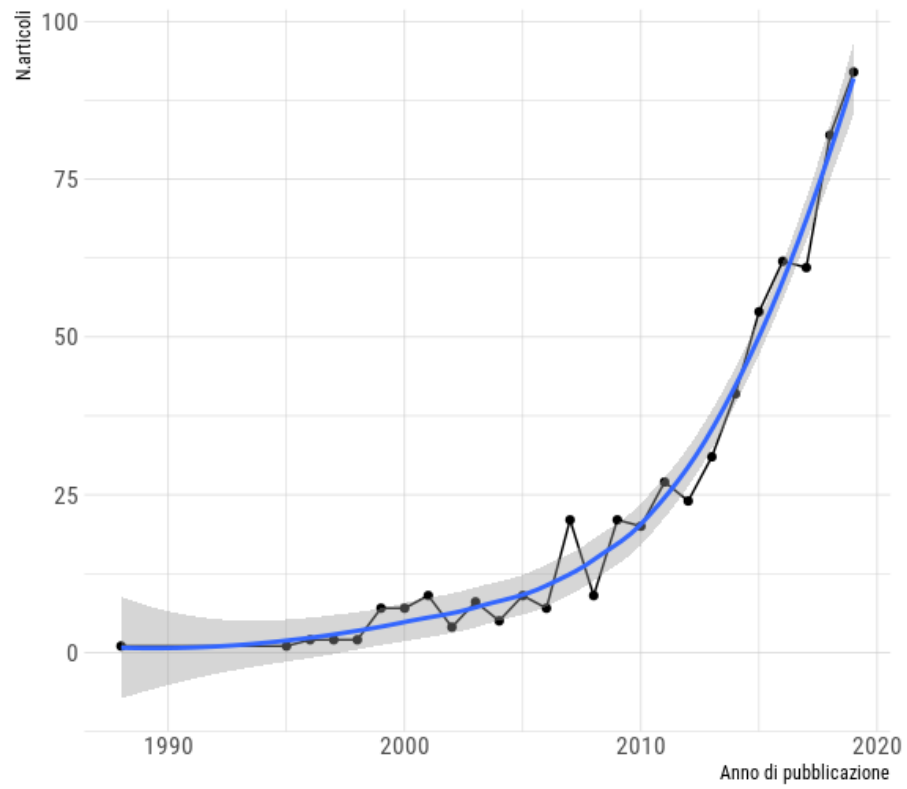


Figura 1: Andamento annuale del numero di pubblicazioni relative all'AMR nella fauna selvatica.

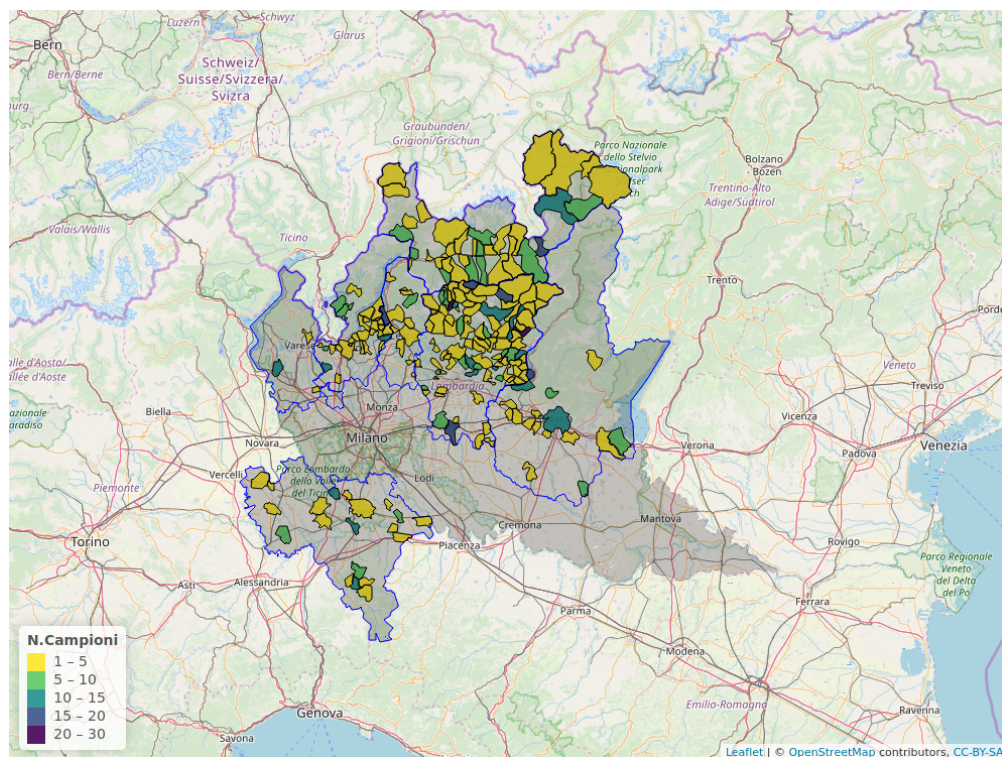


Figura 2: Comuni di provenienza dei campioni

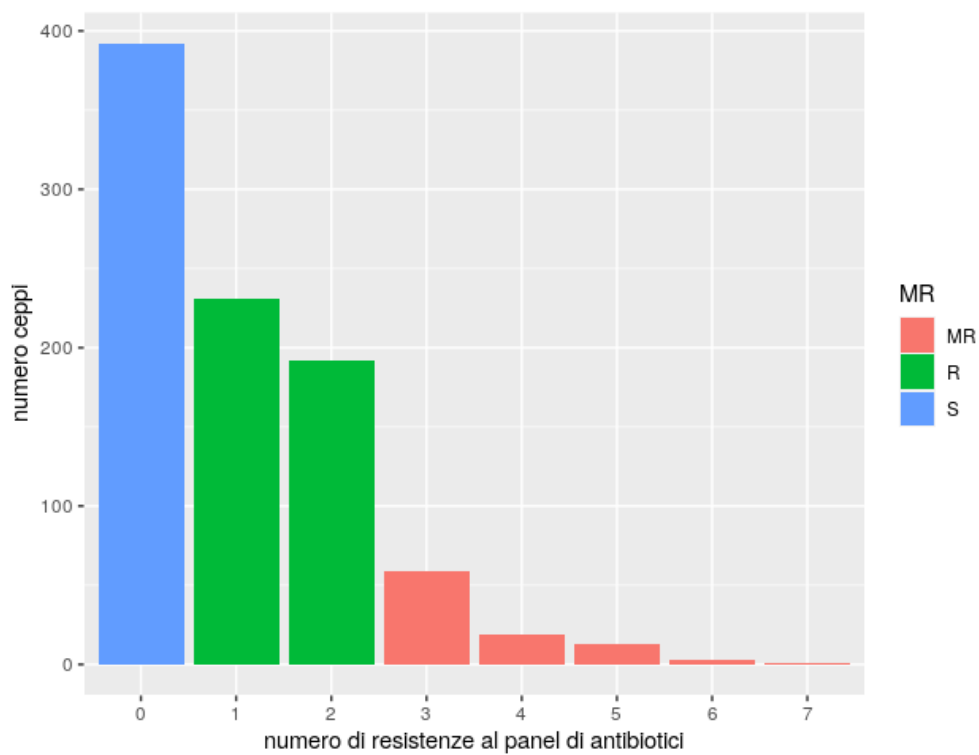


Figura 3: distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici

ELENCO TABELLE

Tabella 1: Caratterizzazione dei comuni di provenienza dei campioni

Parametri	min	q25	median	q75	max	mean	sd
Superficie (Kmq)	1.97	10.6	17.1	29.2	227	29.8	43.9
Densità di popolazione (Ab/Kmq)	4.02	45.1	128.1	257.1	2210	250.7	357.3
Altitudine mediana	48.00	185.0	600.0	1120.0	2650	773.3	684.6
Superficie al pascolo (ettari)	0.09	11.0	60.0	170.9	2630	178.8	338.8
Aziende con pascolo	1.00	3.0	8.0	16.0	425	12.6	20.3
Capi al pascolo	2.00	52.0	133.0	293.0	8429	307.1	602.7

Tabella 2: Distribuzione del numero e in % delle differenti specie di fauna selvatica di origine dei campioni di feci

Gruppo	SPECIE	n	%
CERVIDI	CAPRIOLO	201	70.53
CERVIDI	CERVO	83	29.12
CERVIDI	DAINO	1	0.35
BOVIDI	CAMOSCIO	49	49.49
BOVIDI	MUFLONE	44	44.44
BOVIDI	STAMBECCO	6	6.06
CARNIVORI	TASSO	5	20.83
CARNIVORI	VOLPE	19	79.17
SUIDI	CINGHIALE	78	100.00
LEPRE	LEPRE	4	100.00
CORVIDI	CORNACCHIA	133	88.67
CORVIDI	GAZZA	13	8.67
CORVIDI	GHIANDAIA	4	2.67
RAPACI	ALLOCCO	3	4.41
RAPACI	ASSIOLO	2	2.94
RAPACI	CIVETTA	15	22.06
RAPACI	CIVETTA NANA	1	1.47
RAPACI	FALCO PECCHIAIOLO	7	10.29
RAPACI	GHEPPIO	13	19.12
RAPACI	GUFO REALE	4	5.88
RAPACI	NIBBIO BRUNO	1	1.47
RAPACI	POIANA	8	11.76
RAPACI	SPARVIERO	14	20.59
UCCELLI ACQUATICI	CIGNO REALE	3	20.00
UCCELLI ACQUATICI	CORMORANO	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	FENICOTTERO	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	FOLAGA	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO REALE	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	GERMANO REALE	7	46.67
ALTRI VOLATILI	FAGIANO	3	50.00
ALTRI VOLATILI	PICCIONE	2	33.33
ALTRI VOLATILI	STARNA	1	16.67

Bibliografia

- Ahmed, Marwa Fawzy El Metwaly, Hosny El-Adawy, Helmut Hotzel, Herbert Tomaso, Heinrich Neubauer, Nicole Kemper, Joerg Hartung, and Hafez Mohamed Hafez. 2016. "Prevalence, Genotyping and Risk Factors of Thermophilic *Campylobacter* Spreading in Organic Turkey Farms in Germany." *GUT PATHOGENS* 8 (June). <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0108-2>.
- Allen, Heather K, Justin Donato, Helena Huimi Wang, Karen A Cloud-Hansen, Julian Davies, and Jo Handelsman. 2010. "Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments." *Nature Reviews Microbiology* 8 (4). Nature Publishing Group: 251–59.
- Andersson, Dan I, and Diarmaid Hughes. 2010. "Antibiotic Resistance and Its Cost: Is It Possible to Reverse Resistance?" *Nature Reviews Microbiology* 8 (4). Nature Publishing Group: 260–71.
- Angulo, FJ, VN Nargund, and TC Chiller. 2004. "Evidence of an Association Between Use of Anti-Microbial Agents in Food Animals and Anti-Microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance." *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 51 (8-9). Wiley Online Library: 374–79.
- Baker-Austin, Craig, Meredith S Wright, Ramunas Stepanauskas, and JV McArthur. 2006. "Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance." *Trends in Microbiology* 14 (4). Elsevier: 176–82.
- Bonardi, Silvia, Clotilde Silvia Cabassi, Simona Longhi, Federico Pia, Margherita Corradi, Stefano Gilioli, and Erika Scaltriti. 2018. "Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia Coli* from Mesenteric Lymph Nodes of Wild Boars (*Sus Scrofa*)." *ITALIAN JOURNAL OF FOOD SAFETY* 7 (4): 213–16. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7707>.
- Camarda, Antonio, Elena Circella, Donato Pennelli, Anna Madio, Giordano Bruni, Vito Lagrasta, Giacomo Marzano, Egidio Mallia, and Evelyn Campagnari. 2006. "Wild Birds as Biological Indicators of Environmental Pollution: Biotyping and Antimicrobial Resistance Patterns of *Escherichia Coli* Isolated from Audouin's Gulls (*Larus Audouinii*) Living in the Bay of Gallipoli (Italy)." *ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* 5 (3): 287–90.
- Caprioli, A, G Donelli, V Falbo, C Passi, A Pagano, and A Mantovani. 1991. "Antimicrobial Resistance and Production of Toxins in *Escherichia Coli* Strains from Wild Ruminants and the Alpine Marmot." *Journal of Wildlife Diseases* 27 (2). Wildlife Dis Assoc: 324–27.
- Carattoli, Alessandra. 2013. "Plasmids and the Spread of Resistance." *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6-7). Elsevier: 298–304.

- Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. 2001. "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2). Am Soc Microbiol: 232–60.
- Connell, Sean R, Dobryan M Tracz, Knud H Nierhaus, and Diane E Taylor. 2003. "Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (12). Am Soc Microbiol: 3675–81.
- Foti, Maria, Antonietta Mascetti, Vittorio Fisichella, Egidio Fulco, Bianca Maria Orlandella, and Francesco Lo Piccolo. 2017. "Antibiotic Resistance Assessment in Bacteria Isolated in Migratory Passeriformes Transiting Through the Metaponto Territory (Basilicata, Italy)." *AVIAN RESEARCH* 8 (October). <https://doi.org/10.1186/s40657-017-0085-2>.
- Foti, Maria, Donatella Rinaldo, Annalisa Guercio, Cristina Giacopello, Aurora Aleo, Filomena De Leo, Vittorio Fisichella, and Caterina Mammina. 2011. "Pathogenic Microorganisms Carried by Migratory Birds Passing Through the Territory of the Island of Ustica, Sicily (Italy)." *AVIAN PATHOLOGY* 40 (4): 405–9. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.588940>.
- Foti, Maria, Antonino Siclari, Antonietta Mascetti, and Vittorio Fisichella. 2018. "Study of the Spread of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae from Wild Mammals in the National Park of Aspromonte (Calabria, Italy)." *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY* 63 (October): 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.016>.
- Giacopello, Cristina, Maria Foti, Antonietta Mascetti, Fabio Grosso, Deborah Ricciardi, Vittorio Fisichella, and Francesco Lo Piccolo. 2016. "Antimicrobial Resistance Patterns of Enterobacteriaceae in European Wild Bird Species Admitted in a Wildlife Rescue Centre." *VETERINARIA ITALIANA* 52 (2): 139–44. <https://doi.org/10.12834/VetIt.327.1374.2>.
- Greig, J., A. Rajic, I. Young, M. Mascarenhas, L. Waddell, and J. LeJeune. 2015. "A Scoping Review of the Role of Wildlife in the Transmission of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance to the Food Chain." *ZOOZOSES AND PUBLIC HEALTH* 62 (4): 269–84. <https://doi.org/10.1111/zph.12147>.
- Gullberg, Erik, Sha Cao, Otto G Berg, Carolina Ilbäck, Linus Sandegren, Diarmaid Hughes, and Dan I Andersson. 2011. "Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations." *PLoS Pathogens* 7 (7). Public Library of Science.
- Knapp, Charles W. 2013. "Patricia L. Keen and Mark Himmelford (Eds): Antimicrobial Resistance in the Environment." Springer.

- Kohanski, Michael A, Mark A DePristo, and James J Collins. 2010. “Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis.” *Molecular Cell* 37 (3). Elsevier: 311–20.
- Luo, Naidan, Sonia Pereira, Orhan Sahin, Jun Lin, Shouxiong Huang, Linda Michel, and Qijing Zhang. 2005. “Enhanced in Vivo Fitness of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Jejuni in the Absence of Antibiotic Selection Pressure.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (3). National Acad Sciences: 541–46.
- Organization, World Health, and others. 2019. “Critically Important Antimicrobials for Human Medicine.” World Health Organization.
- Pagano, A, G Nardi, C Bonaccorso, V Falbo, C Passi, V Sanguinetti, and A Mantovani. 1985. “Faecal Bacteria of Wild Ruminants and the Alpine Marmot.” *Veterinary Research Communications* 9 (1). Springer: 227–32.
- Robinson, Timothy P, DP Bu, Juan Carrique-Mas, Eric M Fèvre, Marius Gilbert, Delia Grace, Simon I Hay, et al. 2016. “Antibiotic Resistance Is the Quintessential One Health Issue.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (7). Oxford University Press: 377–80.
- Turchi, Barbara, Marta Dec, Fabrizio Bertelloni, Stanislaw Winiarczyk, Sebastian Gnat, Flavio Bresciani, Fabio Viviani, Domenico Cerri, and Filippo Fratini. 2019. “Antibiotic Susceptibility and Virulence Factors in *Escherichia Coli* from Sympatric Wildlife of the Apuan Alps Regional Park (Tuscany, Italy).” *MICROBIAL DRUG RESISTANCE* 25 (5): 772–80. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0191>.
- Vittecoq, Marion, Sylvain Godreuil, Franck Prugnolle, Patrick Durand, Lionel Brazier, Nicolas Renaud, Audrey Arnal, et al. 2016. “Antimicrobial Resistance in Wildlife.” *JOURNAL OF APPLIED ECOLOGY* 53 (2): 519–29. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>.